

## 学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 488号	学位授与年月日	平成19年 3月14日
氏 名	丸 山 友 香		
論文題目	BMP4 expression in the developing rat retina (発達過程のラット網膜における BMP4 の発現について)		

博士(医学) 丸 山 友 香

## 論文題目

BMP4 expression in the developing rat retina

(発達過程のラット網膜におけるBMP4の発現について)

## 論文の内容の要旨

〔はじめに〕

Bone morphogenetic protein-4 (BMP4)はtransforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) スーパーファミリーに属する分泌タンパクであり、分化、増殖、および様々な細胞機能を調節することが知られている。BMP4は、大きな前駆体として合成された後に細胞内でプロセッシングを受け、成熟タンパクとなる。BMP4の受容体には、それぞれセリン／スレオニンキナーゼ領域を有するタイプⅠ (BMPRⅠA, BMPRⅠB) およびタイプⅡ (BMPRⅡ) があり、それらは細胞膜上に存在する。BMP4が結合すると、タイプⅡレセプターはタイプⅠレセプターをリン酸化して活性化し、タイプⅠレセプターはSmadファミリータンパクをリン酸化することにより細胞内へシグナルを伝達する。BMP4には、競合的アンタゴニスト (noggin, chordin, follistatin, neurogenin-Ⅰ) が存在し、これらによってもその機能の調節を受けている。胎生初期の網膜にBMP4が発現し、水晶体の形成や網膜視蓋投射に重要な役割を果たしていることはよく知られているが、胎生後期から成体の網膜におけるBMP4の発現とその機能に関してはほとんど知られていない。それゆえ本研究においては、免疫組織化学的方法を用いて胎生後期から成体に至るまでのラットの網膜におけるBMP4の発現の分布を調べた。

〔材料ならびに方法〕

1. 免疫組織化学染色に使用する抗BMP4抗体の特異性を証明するために、ELISA法およびWestern blotting法を行った。
2. 免疫組織化学染色のために胎生15日、19日、生後1日、7日、14日、21日、7週齢のWistar系雄ラットを用いた (n=3)。エーテル麻酔下で4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定を行い、眼球を摘出した。凍結後、矢状断にて厚さ12  $\mu\text{m}$  に薄切し、免疫組織染色 (酵素抗体法、蛍光抗体法) を行った。

〔結果〕

### 1. ELISA法およびWestern blotting法

ELISA法では、抗BMP4抗体は、非常に相同性の高い他のタンパクを認識せずに、BMP4のみを認識した。また、網膜を用いたWestern blotting法による結果においてもシングルバンドが観察され、抗体の特異性が証明された。

### 2. 免疫組織化学染色法

胎生15日には、網膜は内神経芽細胞層と外神経芽細胞層から構成されているが、両層にBMP4の免疫反応が観察された。特に、内神経芽細胞層の表層に位置する神経線維層予定域では、BMP4の強い免疫反応が観察され、網膜から視蓋への投射ニューロンである神経節細胞の軸索にBMP4が豊富に発現していることが示唆された。胎生19日には、内神経芽細胞層由来に神経線維層・神経節細胞層・内網状層の3層が形成され、それぞれの層にBMP4の強い免疫反応が観察された。内網状層は神経節細胞とアマクリン細

胞、双極細胞のシナプスが存在する領域であり、BMP4が3者のシナプス形成に影響を与える可能性が示唆された。生後1日目には、内網状層において引き続きBMP4の強い発現が持続していた。神経節細胞では、その軸索に加え、細胞体にもBMP4の強い免疫反応が観察され、神経節細胞の細胞体においてBMP4が重要な役割を果たす可能性があると考えられた。生後7日目には、引き続き、神経節細胞の細胞体にBMP4の強い発現がみられたが、神経線維層と内網状層での発現は減少した。この時期には、内神経芽細胞層由来に、アマクリン細胞、双極細胞、水平細胞、Müller細胞からなる内顆粒層が新たに形成される。今回、生後7日目以後の内顆粒層においてBMP4の発現が見られており、BMP4が内顆粒層内の細胞に対して重要な役割を担う可能性があると考えられた。

神経線維層におけるBMP4の発現について詳細に調べるために免疫染色を行ったところ、BMP4陽性細胞には、アストロサイトのマーカータンパクであるグリア線維性酸性タンパク (GFAP) も同時に発現しており、BMP4がニューロンだけではなくアストロサイトにも発現していることが明らかになった。

### 〔考察〕

BMP4に関する現在までの研究報告は、発生初期の網膜についてのものが多く、それ以後の網膜における発現の報告はほとんどない。本研究の結果から、発生後期から成体に至るまでの網膜においてもBMP4が広く存在することが明らかになった。

ラットの網膜の内網状層では、生後1日から2日目にシナプスのマーカータンパクが発現することが知られており、生後1日目頃に内網状層において、神経節細胞、アマクリン細胞、双極細胞がシナプスを形成するものと考えられている。興味深いことに、今回、この時期の内網状層にBMP4の強い発現が見られたことから、BMP4は、シナプス形成の制御に関与する可能性があると思われる。これまでに、培養海馬ニューロンに、同じファミリーに属するBMP7を加えると急速に樹状突起が伸長し、シナプス形成が促進されること、さらに、BMP7が交感神経ニューロン、大脳皮質ニューロンの樹状突起の伸長も促すことが報告されており、今回内網状層において発現が見られたBMP4は、神経節細胞の樹状突起の伸長に対して重要な作用を有する可能性があると考えられた。

今回の実験から、BMP4は、胎生15日から生後7週まで、神経節細胞とその軸索に発現していることが明らかになった。これまでに、BMP4のアンタゴニストであるventroptinや、BMPタイプIレセプターが網膜視蓋投射に関与するという報告もなされており、今回の結果は、網膜視蓋投射におけるBMP4の重要性をさらに支持するものと考えられた。

BMP4がNMDAによって誘導される網膜細胞のアポトーシスを抑制すること、また、BMPタイプIレセプターが欠失すると内顆粒層内のアマクリン細胞のアポトーシスが増加することが知られており、内顆粒層に発現しているBMP4は、アマクリン細胞等のニューロンの生存因子として働く可能性があると考えられた。

今回、アストロサイトにもBMP4の発現がみられたことから、アストロサイトから分泌されたBMP4は局所の微小環境を調節したり、アストロサイト自身の機能に影響を与えたりしているものと考えられた。

### 〔結論〕

抗BMP4抗体を用いて発達過程のラット網膜におけるBMP4の発現変化を調べた。発生後期から成体に至るまでの網膜にBMP4は、豊富にしかも多様性をもって発現していた。今回の結果から、網膜発生の全過程においてBMP4が機能的に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

Bone morphogenetic protein (BMP) は、Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) スーパーファミリーのサイトカインで、多種類からなり、それぞれ初期発生から成体に至るまでの多様な局面で、分化、増殖、その他の細胞機能を調節していることが解明されつつある。BMPの受容体は、他のTGF- $\beta$  ファミリーと同じく、タイプ I (BMPRIA, BMPRIB) およびタイプ II (BMPRII) からなり、ともにセリン/スレオニンキナーゼ領域を持っている。タイプ I、タイプ II ともに BMP 結合活性を持つが、BMP 存在下で I<sub>2</sub>II<sub>2</sub> のヘテロ4量体をつくり BMP に対して高親和性を示すとともに、タイプ II がタイプ I をリン酸化する。リン酸化により活性化されたタイプ I 受容体は、Smad ファミリータンパクをリン酸化することにより細胞内のシグナルカスケードを活性化して信号を伝える。BMP は、眼の発生過程にも大いに関与しており、特に BMP4 が胎生初期の網膜に発現し、水晶体の形成や網膜視蓋投射に重要な役割を果たしていることはよく知られている。しかし、胎生後期から成体の網膜における BMP4 の発現とその機能に関してはほとんど知られていなかった。そこで、申請者は免疫組織化学染色法を用いて胎生後期から成体に至るまでのラットの網膜における BMP4 の発現の分布を、各発生段階を追って詳細に調べた。

申請者は、まず免疫組織化学染色に用いる抗 BMP4 抗体(市販のモノクローナル抗体)の特異性を証明するために、ELISA 法およびウェスタンブロット法を用いた。ELISA 法では、抗 BMP4 抗体は、BMP の中でも一番相同性の高い BMP2 に結合せず、BMP4 を特異的に認識した。また、ラット眼抽出液を SDS-PAGE で分離して同抗体を用いてウェスタンブロット法で解析したところ、シングルバンドが認められた。さらに、ラット眼の凍結切片を用いて、抗原 BMP4 で吸収した抗体を用いて免疫組織化学染色を行ったところ、非吸収抗体に比して、抗体結合がほとんど見られなかった。これらの結果より、用いた抗体の特異性は十分証明されたと言える。ラットの免疫組織化学染色のためには、胎生15日、19日、生後1日、7日、14日、21日、7週齢のWistar系雄ラットを用いた。エーテル麻酔下で4%パラホルムアルデヒドにて浸漬固定または灌流固定(生後の場合)を行い、眼球を摘出した。凍結後、矢状断にて厚さ12 $\mu$ m に薄切し、免疫組織染色(酵素抗体法、および蛍光抗体法)を行った。

胎生15日では、網膜は内神経芽細胞層と外神経芽細胞層から成っているが、両層ともに BMP4 の免疫反応が観察された。特に、内神経芽細胞層の表層に位置する神経線維層予定域で、強い染色が見られ、網膜から視蓋への投射ニューロンである神経節細胞の軸索に BMP4 が多く存在することが示唆された。胎生19日では、内神経芽細胞層由来の3層(神経線維層、神経節細胞層、内網状層)が形成されるが、それぞれの層に BMP4 の強い免疫反応が観察された。内網状層は、神経節細胞とアマクリン細胞、双曲細胞のシナプスが存在する領域であり、BMP4 が3者のシナプス形成に影響を与える可能性が示唆された。生後1日目では、内網状層において引き続き BMP4 の強い染色像が認められた。神経節細胞では、軸索に加えて、胎生19日では見られなかった細胞体にも強い免疫反応が見られた。また内網状層は、胎生19日よりさらに強い染色像を示した。生後7日目では、神経節細胞の細胞体はさらに強く染色されたが、神経線維層および内網状層では染色強度は減弱した。この時期に内神経芽細胞層から由来して形成される内顆粒層(アマクリン細胞、双極細胞、水平細胞、ミュラー細胞)も BMP4 の免疫反応が認められた。生後14日目以降では、同時期から出現する光受容細胞でも BMP4 の免疫反応が見られ、他の各層では、生後7日目とほぼ同様の染色像が維持された。次に、BMP4 がアストロサイトで発現している可能性を調べるために、BMP4 抗体とアストロサイトのマーカータンパクである GFAP (グリア細胞酸性タンパク) を用いて、7週齢ラットの眼組織に対して蛍光二重抗体染色を行った。その結果、神経節細胞および軸索よりさらに内側に、両抗体で同時に染色される細胞を認め、アストロサイトも BMP4 を発現していることが示された。

この研究は、今までほとんど文献に記載がなかった発生後期の眼におけるBMP4の発現を、発生段階を追って詳細に解析し、眼の各層構造の分化、形成とともにBMP4の発現量がダイナミックに変動することを明瞭に示した初めての報告であり、審査委員会では、この点を特に高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 用いた抗BMP4モノクローナル抗体の濃度とエピトープについて
- 2) 灌流固定法で、細胞外に存在するBMP4が固定されうるか
- 3) BMP4抗体による神経節細胞軸索周囲の染色像をどのように解釈するか
- 4) 神経節細胞－アマクリン細胞－双極細胞－視細胞のシナプス形成とBMP4発現の関連について
- 5) アストロサイトおよびミュラー細胞におけるBMP4の発現について
- 6) *in situ*ハイブリダイゼーション法について
- 7) ラット眼におけるBMP4受容体の発現分布と時間変化について
- 8) ラットで視覚の成立時期とBMP4発現様態の関連について
- 9) 胚発生期、新生仔期および成体におけるBMP4の予想される機能について
- 10) BMP4のノックアウトマウスの症状、眼の構造異常について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	蓑	島	伸	生	
	副査	福	田	敦	夫	副査 宮 嶋 裕 明